



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Curso de Farmácia

JÚLIA FONTES TÔRRES

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA INFECÇÃO DE CÉLULAS
PC12-ADH COM O ZIKA VÍRUS**

Brasília

2017

Júlia Fontes Tôres

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA INFECÇÃO DE CÉLULAS
PC12-ADH COM O ZIKA VÍRUS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília
como parte das exigências para obtenção
do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profª Drª Djane Braz Duarte

Brasília

2017

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA INFECÇÃO DE CÉLULAS
PC12-ADH COM O ZIKA VÍRUS**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a Djane Braz Duarte

(FS/ Universidade de Brasília)

Dr^a. Mariella Guimarães Lacerda

(FS/Universidade de Brasília)

Ms. Cinthia Gabriel Meirelles

(FS/Universidade de Brasília)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por permitir que tudo isso acontecesse, e não somente nestes anos como universitária, mas que em todos os momentos é o maior mestre e direcionador. Agradeço por me proporcionar saúde, força e determinação para realizar esse projeto e com isso concluir a graduação com sucesso, superando todas as dificuldades encontradas durante a caminhada.

Aos meu pais, Eduardo, Rosângela e a minha irmã Isabel, por todo amor, incentivo e apoio emocional. Meu agradecimento a vocês é enorme e fico sem palavras para descrever o tanto que vocês foram importantes para que eu conseguisse chegar até aqui, sempre me incentivando nas horas difíceis e de desânimo e cansaço.

Aos meus amigos de curso, companheiros de todos os momentos vivenciados na graduação, que guardarei comigo para sempre. Vocês foram essenciais nessa jornada, compartilhando juntos nossas alegrias e tristezas e fortalecendo as amizades.

A minha orientadora Djane Duarte, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar esse projeto com toda a sua orientação, competência e dedicação para comigo. Todo o seu ensino, suporte e incentivos foram essenciais para minha formação. Obrigada pela paciência, pelo convívio, pela compreensão e pela amizade.

Ao meu namorado Avner, que de uma forma especial foi muito importante nessa caminhada final do curso. Obrigada pelo carinho, por sua paciência e compreensão com a correria do dia a dia, e por sua capacidade de me trazer paz e tranquilidade em meio as situações difíceis.

E finalizo agradecendo à Universidade de Brasília, pela oportunidade de realização e conclusão do curso de Farmácia e aos Laboratórios de Farmacologia Molecular e Virologia Molecular, por me proporcionarem a oportunidade de realizar todos os experimentos, essenciais para o desenvolvimento de todo esse projeto.

À Deus seja toda a glória!

“Tudo o que fizerem, seja em palavra ou em ação, façam-no em nome do Senhor Jesus, dando por meio dele graças a Deus Pai”.

Colossenses 3:17

RESUMO

O vírus da Zíka (ZIKAV) é transmitido pela picada do mosquito fêmea *Aedes aegypti*, pertence ao gênero dos *Flavivirus*, e é um dos vírus mais importantes emergentes do mundo. A epidemia só ganhou destaque quando diversos casos de microcefalia foram registrados em crianças, filhas de mulheres suspeitas de infecção com ZIKAV no Brasil, e também quando o aparecimento de adultos com Síndrome de Guillain-Barré foram confirmados, em pessoas com histórico de infecção por este vírus. Assim, a comunidade científica busca cada vez mais entender e descobrir o motivo pelo qual o ZIKAV pode causar sintomas neurológicos nos pacientes infectados. Com isso, buscando contribuir com esses estudos, utilizamos modelo experimental *in vitro* de células PC12-ADH, que são derivadas do feocromocitoma de ratos transplantados, e expressam propriedades neuronais por meio do crescimento de neuritos quando estimuladas com o Fator de Crescimento do Nervo (NGF). Buscamos então estabelecer um modelo *in vitro* de infecção pelo ZIKAV nas células PC12-ADH, primeiramente implementando protocolo de diferenciação destas células e investigando a densidade ideal de células/poço para uma visualização satisfatória do crescimento de neuritos. A densidade de células foi determinada a 80.000/poço e subsequentemente as mesmas foram expostas ao ZIKAV para a infecção, que foi avaliada pela detecção da glicoproteína-E do envelope viral por meio da técnica de Western blot. Embora o protocolo de diferenciação celular de PC12-ADH em neurônios tenha sido estabelecido, não observamos infecção das células pelo ZIKAV nas condições experimentais avaliadas. Novos ensaios serão necessários para investigar a susceptibilidade de células PC12-ADH ao ZIKAV.

Palavras-chave: ZIKAV, Síndrome de Guillain-Barré, células PC12-ADH, diferenciação celular, NGF.

ABSTRACT

The Zika Virus (ZIKV) is transmitted through the female *Aedes Aegypti* mosquito bite, which belongs to the Flavivirus genus and it is one of the most important and emerging viruses of the world. The epidemic only gained prominence when multiple cases of microcephaly were diagnosed in children who were born from women that were suspected of being infected with ZIKV in Brazil and when adults with the Guillain-Barré Syndrome were confirmed in people that had been infected with the virus. Thus, the scientific community seeks to understand and discover the reason that the ZIKV may cause neurological symptoms on the infected patients. With that, seeking to contribute with those studies, we utilized experimental models “in vitro” of P12 cells, which are derived from the Pheochromocytoma of transplanted mice, because they express neural properties through the growth of neurospheres, utilizing the Neural Growth Factor (NGF). We sought to establish an “in vitro” model of the ZIKV infection in PC12-ADH cells, implementing firstly a differentiation protocol of such cells and investigating the ideal density of cells to visualize a satisfactory growth of the neurospheres. The density of the cells was determined in 80.000 cells/well and subsequently the same were exposed to ZIKV for infection, which was evaluated by the detection of the E-glycoprotein of the viral envelope through the Western blot technique. Although the cell differentiation protocol of PC12-ADH in neurons was established, we did not observe infection of the cells by ZIKV in the experimental conditions evaluated. Further testing will be required to investigate the susceptibility of PC12-ADH cells to ZIKV.

Key words: ZIKV, Guillain-Barré syndrome, PC12-ADH cells, cell differentiation, NGF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do Flavivirus icosaédrico envolvido, incluindo três proteínas e o material genético.

Figura 2: Distribuição do zika vírus pelo mundo de 1947 até 2016. (Fonte: Morris et al., 2017).

Figura 3: Resumo dos principais sintomas das doenças dengue, chikungunya e zika. Fonte: FIOCRUZ

Figura 4: Esquema de cultura de células PC12-ADH em processo de diferenciação celular.

Figura 5: Neuritogênese de células tratadas com NGF (100 ng/mL). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 20.000 células/poço no dia 5 da diferenciação.

Figura 6: Visão geral das células com 50.000 células/poço, com poucos neuritos. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 50.000 células/poço no dia 5 da diferenciação.

Figura 7: Células contaminadas com fungos. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 200x), com 130.000 células/poço

Figura 8: Visão geral da densidade de 130.000 células/poço. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x) no dia 1 da diferenciação.

Figura 9: Visualização de grânulos nas células. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 130.000 células/poço no dia 5 da diferenciação.

Figura 10: Células PC12-ADH no primeiro dia com NGF (100ng/mL). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 100.000 células/poço no dia 1 da diferenciação.

Figura 11: Células PC12-ADH no quarto dia com NGF (100ng/mL). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 100.000 células/poço no dia 4 da diferenciação.

Figura 12: Células PC12-ADH no último dia da cultura celular. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 100.000 células/poço no dia 7 da diferenciação.

Figura 13: Visualização do crescimento de neuritos em placas com 80.000 células por poço, sem tratamento com PDL. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x) no dia 7 da diferenciação.

Figura 14: Visualização do crescimento de neuritos em placas com 80.000 células por poço, sem tratamento com PDL. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x) no dia 7 da diferenciação.

Figura 15: Visão geral das PC12-ADH com a densidade ideal estabelecida, de 80.000 células/poço, com pré-tratamento da placa. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x) no dia 1 da diferenciação.

Figura 16: Neuritogênese observada após 5 dias com NGF (100 ng/mL). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 200x) no dia 5 da diferenciação.

Figura 17: Neuritogênese observada após 5 dias com NGF (100 ng/mL). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x) no dia 5 da diferenciação.

Figura 18: Crescimento de neuritos observado em cultura sem suplementação com NGF. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x).

Figura 19: Crescimento de neuritos observado em cultura sem suplementação com NGF. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 200x).

Figura 20: A) Representação do Western blot com o Anti-Flavivirus. B) Representação do Western blot com Actina.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| AMAN | Neuropatia Motora Axonal Aguda |
| BCRJ | Banco De Células Do Rio De Janeiro |
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| CHPF | Centro Hospitalar Da Polinésia Francesa |
| CPN | Células Progenitoras Neurais |
| Criotubos | Frascos De Cultura Celular |
| DC-SIGN | do inglês Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin |
| DMSO | Dimetil Sulfóxido |
| FarMol | Laboratório de Farmacologia Molecular da UnB |
| HS | Soro De Cavalo |
| LB | Luria-Bertani |
| MD | Meio De Diferenciação |
| NGF | Fator de Crescimento do Nervo |
| NS | Proteínas não estruturais |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PDL | Poli-D-Lisina |
| RNA vírus | Ácido Ribonucleico De Cadeia Simples |
| SDS-PAGE | Eletroforese Em Gel De Poliacrilamida |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SGB | Síndrome de Guillain-Barré |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SNP | Sistema Nervoso Periférico (neurônios simpáticos) |

ZIKAV

Zika vírus

SUMÁRIO

| | |
|---|---------------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 Zika Vírus..... | 14 |
| 1.2 Histórico da doença..... | 15 |
| 1.3 Manifestações Clínicas..... | 18 |
| 1.4 Modelos experimentais para estudo da Zika..... | 21 |
| 2 OBJETIVOS..... | 24 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 25 |
| 3.1 Reagentes..... | 25 |
| 3.2 Cultura de células..... | 25 |
| 3.3 Diferenciação celular..... | 26 |
| 3.4 Infecção das células pelo ZIKAV..... | 27 |
| 3.5 Detecção de proteínas do ZIKAV em células PC12-ADH por meio da técnica de Western Blot..... | 28 |
| 4 RESULTADOS..... | 30 |
| 4.1 Estabelecimento da densidade ideal de células para o ensaio de diferenciação celular..... | 30 |
| 4.2 Diferenciação de células PC12-ADH sem adição de NGF..... | 39 |
| 4.3 Avaliação da infecção do ZIKAV nas células PC12-ADH..... | 40 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 42 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 47 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 48 |

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Zika Vírus

O Zika vírus (ZIKAV) é um dos mais importantes vírus emergentes no mundo e foi descrito pela primeira vez em 1947, em macacos infectados numa floresta conhecida como Zika, localizada em Uganda, país na África Oriental (Olagnier et al., 2016).

O ZIKAV pertence à família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*, juntamente com o vírus da dengue, chikungunya, febre amarela, encefalite japonesa e encefalite do carrapato (Olagnier et al., 2016). O vírus é transmitido pela picada do mosquito fêmea *Aedes aegypti*, mas existem outras formas de contrair o vírus. De acordo com dados da FIOCRUZ, o vírus da Zika permanece ativo em saliva, urina, sêmen, leite materno, líquido e líquido amniótico. A transmissão também pode ocorrer através de produtos de transfusão de sangue, durante a gravidez e durante o período perinatal (Brasil et al., 2016).

O genoma dos vírus do gênero *Flavivirus* codifica 10 proteínas virais que são clivadas de uma poliproteína. Consiste em três proteínas estruturais, capsídeo (C), membrana (M), envelope (E), formando o virion e sete proteínas não estruturais (NS) 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B e 5 (Huang et al., 2014). A replicação do vírus ocorre no citoplasma da célula hospedeira, e seu material genético é composto por ácido ribonucleico de cadeia simples (RNA vírus).

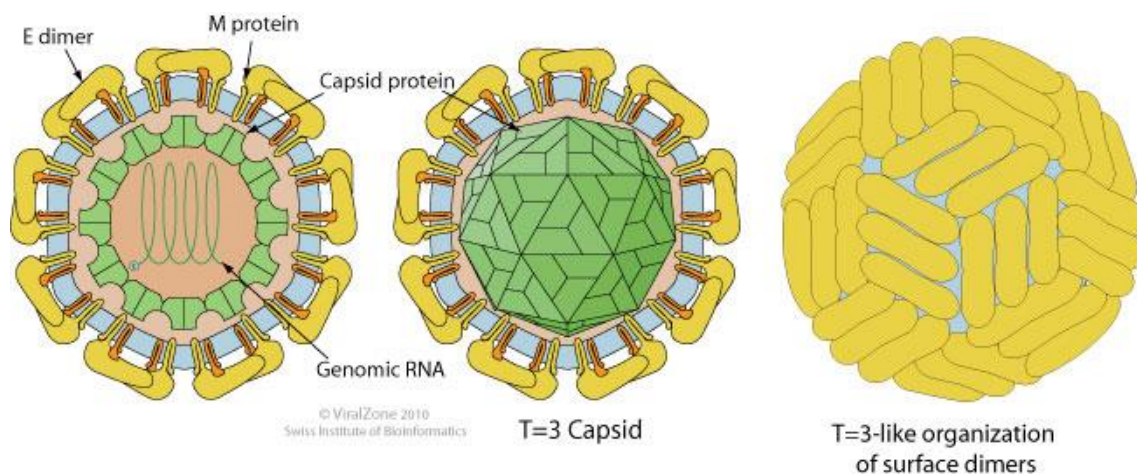


Figura 1: Representação do Flavivirus icosaédrico envolvido, incluindo três proteínas e o material genético. Fonte: <<https://flavivirus.wordpress.com/general-flavivirus-info/>>.

Quando uma fêmea do mosquito *Aedes* alimentada de sangue infectado injeta o vírus na pele do hospedeiro mamífero, células permissivas são infectadas, incluindo fibroblastos da derme, os queratinócitos epidérmicos e células dendríticas imaturas, através de receptores específicos como DC-SIGN (do inglês Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) também conhecido como CD209, o receptor de tirosina quinase AXL, o receptor Tyro3, e, em menor grau, o TIM-1 (do inglês receptor T cell immunoglobulin mucin domain). A patogênese da infecção pelo ZIKAV ainda não é totalmente compreendida, pois o vírus da ZIKA recebeu menos atenção do que os outros arbovírus (Hamel et al., 2015), mas diversos estudos estão se desenvolvendo, devido ao grande destaque que a doença ganhou e suas importantes complicações.

1.2 Histórico da Doença

A epidemia de ZIKAV ganhou destaque internacional depois que diversos casos de microcefalia ocorridos no Brasil foram registrados em crianças filhas de mulheres suspeitas de infecção pelo vírus. A Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou um alerta e decretou estado de emergência devido ao aumento de casos de microcefalia em zonas endêmicas para o Zika vírus (Gulland, A, 2016). O primeiro relato de infecção pelo vírus foi em Uganda, em 1954, e mais tarde o vírus também foi encontrado em seres humanos no sudeste da Ásia (Hamel et al., 2015).

No entanto, o primeiro surto da doença fora do continente Africano ocorreu na ilha de Yap, nos Estados Federados da Micronésia, na Oceania, em abril de 2007, onde cerca de 75% da população estava infectada. Em 2013 ocorreu um surto na Polinésia Francesa, onde mais de 32 mil casos suspeitos foram registrados (Cao-Lormeau et al., 2017). Em seguida, vários outros casos de infecção por ZIKAV também foram relatados no Pacífico (Nova Caledônia, Ilha de Páscoa e nas Ilhas Cook) (Hamel et al., 2015).

Também em 2013, houve o primeiro caso do vírus da Zika na Europa, vindo de um viajante tailandês. Caso foi confirmado pela presença de anticorpo Anti-ZIKAV IgM e IgG e de anticorpos neutralizantes de ZIKAV no sangue do paciente. Esse tipo de ocorrência do vírus também foi descrito em outros países, como Austrália, Japão, Estados Unidos, Canadá, Noruega e Itália (Zanluca & Santos, 2016). Com isso, sabe-se que este vírus possui elevado potencial de disseminação por diversos fatores, como por exemplo, os vários surtos que já foram relatados, a velocidade com que o vírus se propagou pelas Américas, a detecção do ZIKAV em diversas regiões do mundo e principalmente porque estudos comprovaram que o vírus que emergiu da América do Sul e do Pacífico, são da mesma linhagem asiática (Morris et al., 2017). A figura a seguir ilustra os dados citados anteriormente.

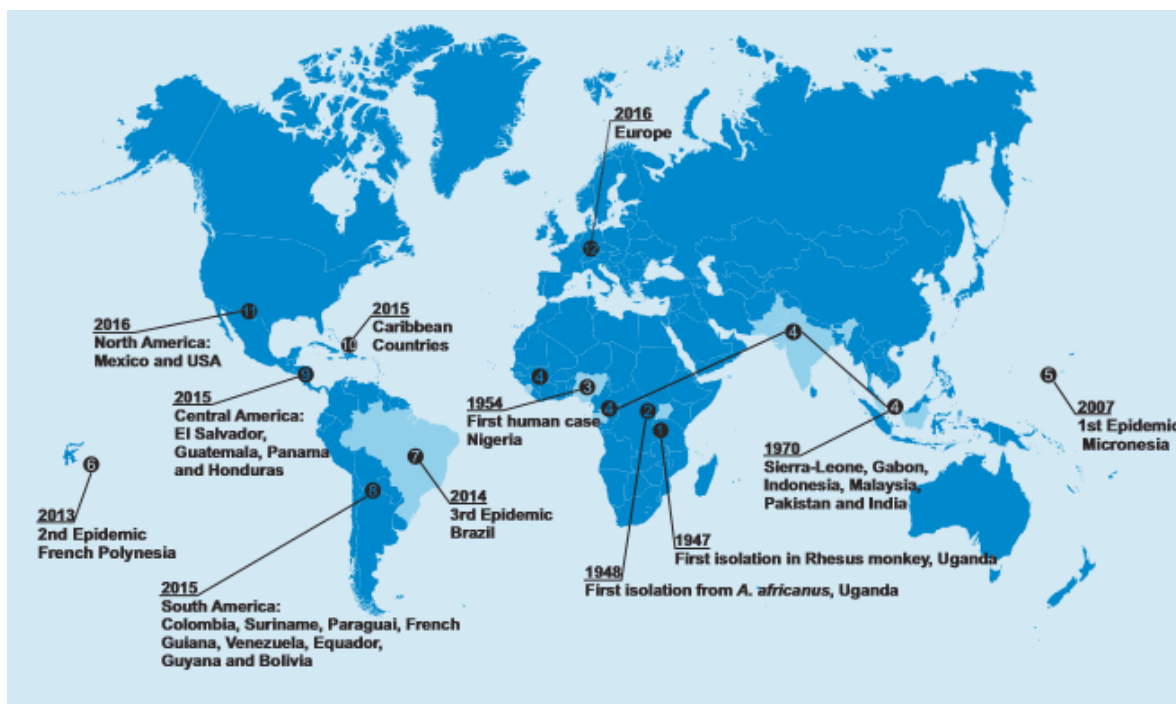


Figura 2: Distribuição do zika vírus pelo mundo de 1947 até 2016. (Fonte: Morris et al., 2017).

Em abril de 2015, sabe-se que o vírus começou a ser disseminado pelo Brasil, onde os primeiros casos identificados foram na região Nordeste. O vírus logo se espalhou pelo país durante os anos de 2015 e 2016, onde 22 estados brasileiros confirmaram a transmissão do ZIKAV (Zanluca & Santos, 2016). De acordo com dados do Ministério da Saúde, em 2016 foram registrados 196.976 casos suspeitos de febre pelo ZIKAV no país, distribuídos em 2.227 municípios. Dentre esses casos, 101.851 foram confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Em agosto de 2015, observou-se um aumento da incidência da microcefalia em Pernambuco, e com isso, um estudo com 104 crianças que nasceram com microcefalia nos hospitais de Pernambuco foi feito, com objetivo de estudar as características clínicas dos recém-nascidos (Martelli, Magalhães & Rego, 2016). De acordo com esses acontecimentos concomitantes, questionamentos sobre a possível relação entre a microcefalia e a infecção pelo ZIKAV começaram a aparecer, e diversos estudos foram realizados.

Em novembro de 2015, foi lançada a primeira Diretriz Nacional de Microcefalias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016), e nesse mesmo mês, o ZIKAV foi

encontrado no líquido amniótico de gestantes na Paraíba por pesquisadores de Instituto Oswaldo Cruz, e também em tecido de recém-nascido com microcefalia, que evoluiu para óbito no Ceará (Nunes et al., 2016). O primeiro sequenciamento genético completo do vírus da Zika associado a um caso de microcefalia foi encontrado, e demonstrou 97% de homologia com relação ao genoma do vírus responsável pelo surto da Polinésia Francesa (Calvet et al., 2016). Assim foi confirmada a relação microcefalia e ZIKAV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A provável associação da Zika com malformações fetais e morte está em constante investigação devido aos relatos de casos suspeitos de microcefalia em recém-nascidos e mortes devido a malformação congênita que podem estar associadas ao vírus da Zika (Zanluca & Santos, 2016). Um recente estudo publicado relata que a proteína Musashi-1 (MSI1) interage com o genoma do vírus da Zika e permite a replicação viral. Essa proteína é expressa em células progenitoras neuronais em cérebro embrionário humano e sofre mutação em indivíduos com microcefalia, ou seja, isso pode explicar o motivo pelo qual essas células que ainda estão em desenvolvimento são vulneráveis ao ZIKAV (Chavali et al., 2017). Outros estudos, como Nunes et al. 2016, evidenciam que o ZIKAV atravessa a barreira placentária e atinge os tecidos fetais. O objetivo maior agora está em deter essa interação e a doença.

1.3 Manifestações Clínicas

O período entre a infecção do vírus e as manifestações clínicas pode variar de 3 a 12 dias. As manifestações clínicas do ZIKAV podem ser diversas, mas os sintomas mais frequentes são erupção maculopapular cutânea, febre, artrite ou artralgia, dores de cabeça, conjuntivite, rash cutâneo e prurido (Zanluca & Santos, 2016).

As principais diferenças entre Dengue, Zika e Chikungunya é com relação a intensidade das manifestações clínicas apresentadas, e pelo fato dos sintomas serem semelhantes, existe uma dificuldade quanto ao diagnóstico. A Fundação Oswaldo Cruz realiza um trabalho focado no desenvolvimento desses diagnósticos, pois as doenças exigem tratamentos diferentes. O quadro comparativo a seguir

(figura 3) mostra os sintomas apresentados em indivíduos infectados por essas três doenças.



| | | DENGUE | CHIKUNGUNYA | ZIKA |
|---------------------|--|--|---|--|
| PRINCIPAIS SINTOMAS | FEBRE | Sempre presente: alta e de início imediato | Quase sempre presente: alta e de início imediato | Pode estar presente: baixa |
| | ARTRALGIA (DORES NAS ARTICULAÇÕES) | Quase sempre presente: dores moderadas | Presente em 90% dos casos: dores intensas | Pode estar presente: dores leves |
| | RASH CUTÂNEO (MANCHAS VERMELHAS NA PELE) | Pode estar presente | Pode estar presente: se manifesta nas primeiras 48 horas (normalmente a partir do 2º dia) | Quase sempre presente: se manifesta nas primeiras 24 horas |
| | PRURIDO (COCEIRA) | Pode estar presente: leve | Presente em 50 a 80% dos casos: leve | Pode estar presente: de leve a intensa |
| | VERMELHIDÃO NOS OLHOS | Não está presente | Pode estar presente | Pode estar presente |

Figura 3: Resumo dos principais sintomas das doenças dengue, chikungunya e zika. Fonte: FIOCRUZ

O ZIKAV também possui manifestações clínicas graves, sendo comumente associado com malformação congênita durante a gravidez (microcefalia) e com a síndrome de Guillain-Barré (SGB), que pode levar a paralisia e morte (Solomon et al., 2016). Embora a microcefalia seja uma das consequências mais graves da doença ZIKA, o foco deste trabalho é o estudo da relação entre o ZIKAV e o sistema nervoso periférico.

Em adultos, a complicação mais grave relacionada com o Zika vírus é a síndrome de Guillain-Barré. Em julho de 2015, o Brasil notificou pacientes com síndromes neurológicas, incluindo casos de SGB confirmados, com um histórico de infecção pelo ZIKAV (Nunes et al., 2016). A SGB é uma doença de origem autoimune pós-infecção, de importância neurológica, que provoca uma fraqueza muscular generalizada. Sabe-se que a Síndrome de Guillain-Barré ocorre na maioria das vezes após uma infecção viral ou bacteriana. Estudos abordam a hipótese de que o organismo do paciente desenvolve uma reação imunológica contra o vírus ou bactéria, para combater a infecção. Esses agentes infecciosos podem então ser reconhecidos pelo sistema imunológico como antígenos, levando assim a uma produção de anticorpos específicos, devido a uma resposta gerada contra esses antígenos (Beneti & Silva, 2006).

Mas existem algumas estruturas dos vírus ou bactérias que são muito semelhantes com a bainha de mielina que reveste as células nervosas. Assim, os anticorpos produzidos em função da infecção induzem a desmielinização do nervo, levando ao quadro clínico de Guillain-Barré (Funes; Monteiro; Carranza, 2002). Isso ocorre devido a produção inapropriada de anticorpos contra a bainha de mielina, chamados de anticorpos antigangliosídeos, ocorrendo a desmielinização do nervo. Os gangliosídeos são oligossacarídeos presentes na membrana neuronal e a destruição dos mesmos leva a lesão na bainha de mielina. Essa desmielinização é capaz de bloquear uma condução nervosa causando assim perda de função do nervo, semelhante a degeneração axonal (Funes; Monteiro; Carranza, 2002). Desta forma, no diagnóstico da SGB, a dosagem de anticorpos anti-gangliosídeos é muito importante (Tavares et al., 2000).

Entre outubro de 2013 e abril de 2014, a Polinésia Francesa apresentou o maior surto do vírus da Zika já descrito nesse momento, como citado anteriormente. Durante o mesmo período, um aumento da síndrome de Guillain-Barré foi relatado, sugerindo uma possível associação entre o ZIKAV e síndrome de Guillain-Barré. Um estudo de caso controle foi realizado com pacientes diagnosticados com SGB no Centro Hospitalar da Polinésia Francesa (CHPF), durante o período do surto. Quarenta e dois pacientes foram diagnosticados com a síndrome de Guillain-Barré, e dentre esses, 41 (98%) tinham anticorpos contra o ZIKAV. Por outro lado, 13 pacientes (31%) apresentaram anticorpos anti-gangliosídeos, sugerindo assim possível diagnóstico de neuropatia motora axonal aguda (AMAN), que é uma variante da SGB. Esse foi o primeiro estudo realizado com um grande número de pacientes que desenvolveram a Síndrome de Guillain-Barré depois de uma infecção pelo vírus da Zika, e o primeiro estudo a fornecer uma evidência de que o ZIKAV pode desencadear essa síndrome (Lormeau et al., 2016).

Existe um empenho muito grande da comunidade científica, tanto nacional quanto internacional, em descobrir por que o ZIKAV causa sintomas neurológicos nos pacientes infectados. Para a compreensão da patogênese da infecção viral no sistema nervoso central (SNC), é fundamental o entendimento sobre o tropismo do ZIKAV, ou seja, a capacidade que ele tem de infectar as células desse sistema. Sabe-se que o ZIKAV pode ter tropismo neural elevado uma vez que tanto injeção

intracerebral em modelos animais como transmissão intrauterina em fetos, resultam em replicação viral no SNC (Tsunoda et al., 2016). Vale ressaltar que estudos sugerem que o ZIKAV infecta a placenta e em seguida as células progenitoras neuronais do cérebro fetal, além de que também a inoculação viral em ratos resulta em neurodegeneração. Não obstante, sabe-se que outros vírus da família *Flaviviridae* possuem tropismo neural e causam doenças neurológicas, logo não é surpreendente que o ZIKAV possua tropismo neural (Li et al., 2016)

Para estudar a interação do ZIKAV e o sistema nervoso, uma das ferramentas que pode ser utilizada é a experimentação *in vitro*. Modelos experimentais *in vitro* possibilitam o estudo de células isoladas e pode contribuir para o estabelecimento de vias de sinalização e mecanismos moleculares que são difíceis de avaliar *in vivo*. Para realizar estudos neurobiológicos e neuroquímicos, a utilização das células PC12-ADH é um modelo extremamente útil.

1.4 Modelos experimentais para estudo da Zika

Desde o surto de ZIKAV no Brasil, diversos trabalhos foram publicados utilizando tanto estudos *in vivo*, quanto *in vitro*. Algumas metodologias empregadas variavam desde o uso de cultura de células Vero e BHK-21 (Nikolay et al., 2017), a estudos em camundongos prenhas da linhagem C57BL/6 levando a microcefalia nos embriões (Cugola et al., 2016).

Com o intuito de estudar a relação entre o ZIKAV e o sistema nervoso periférico, serão utilizadas neste trabalho as células PC12-ADH. Estas, são células imortalizadas que, dependendo do estímulo, podem adquirir fenótipo neuronal, podendo assim serem utilizadas em estudos de diferenciação neuronal (Greene & Tischler, 1976). Essas células foram clonadas a partir de um tumor nas glândulas suprarrenais de ratos, conhecido como feocromocitoma, secretam catecolaminas, principalmente dopamina (Fujita, Lazarovici e Guroff, 1989). O feocromocitoma é um tumor neuroendócrino raro originado do tecido cromafim da medula adrenal, que geralmente são tumores benignos, mas que provocam superprodução de catecolaminas (dopamina, adrenalina e noradrenalina) causando principalmente hipertensão (Sbardella et al., 2017).

As células cromafins são as mais abundantes encontradas na medula da glândula suprarrenal. Sabe-se que os neurônios simpáticos e as células cromafins possuem algumas semelhanças, como por exemplo, os mecanismos de síntese de noradrenalina (transmissor adrenérgico) (Unsicker et al., 1978), e é por isso que as PC12-ADH expressam propriedades semelhantes às de neurônios na diferenciação. Quando cultivadas em meio de cultura contendo somente soro de cavalo, as células PC12-ADH sofrem mitose e desenvolvem propriedades de células cromafins da glândula adrenal, como sintetizar, armazenar e liberar catecolaminas, e presença de grânulos de cromatina (Lloyd a. Greene, 1978).

É possível induzir diferenciação celular nas células PC12-ADH, produzindo um fenótipo neuronal, chamado de neurônio *like* utilizando-se o Fator de Crescimento do Nervo (NGF). A diferenciação pode ser observada com a formação de neuritos, que é toda e qualquer extensão celular, uma vez que diferenciar entre axônios ou dendritos *in vitro* não é possível, pois o crescimento das projeções nas células se dá de forma irregular. Na presença de NGF, as células PC12-ADH cessam a divisão celular, tornam-se eletricamente excitáveis, ocorre prolongação de neuritos longos e ramificados, aumento da sensibilidade química à acetilcolina e gradualmente adquirem características de neurônios simpáticos (Lloyd a. Greene, 1978).

Após a diferenciação, as células PC12-ADH expressam também, a Proteína Associada ao Crescimento, GAP-43, que é essencial para a fase de crescimento dos neurônios (Jesky & Chen, 2016). A proteína GAP-43 é considerada pré-sináptica que está localizada na membrana plasmática do axônio, participando assim das transduções de sinais nos terminais nervosos. Estudos mostram que essa proteína exerce papel fundamental no crescimento dos axônios, desenvolvimento do sistema nervoso, regeneração nervosa e formação das sinapses (Zhang et al., 2016), e por isso, é considerada uma proteína determinante para que ocorra a proliferação de neuritos.

Com isso, podemos inferir que o desenvolvimento dos neuritos se assemelha a muitos mecanismos intracelulares dos neurônios. Por possuírem essas características, as células PC12-ADH serão utilizadas neste projeto para compreender o comportamento dessas células frente a uma infecção com o ZIKAV,

estabelecendo protocolos específicos para cada etapa, tanto de cultura celular como de infecção e correlacionar com as possíveis doenças neurodegenerativas. Dentro deste contexto, um estudo molecular se faz necessário para esclarecer os mecanismos relacionados entre o dano neuronal e a infecção pelo ZIKAV. Como a síndrome de Guillain-Barré está sendo relacionada à infecção pelo vírus da Zika, estudos complementares são necessários para demonstrar se as lesões causadas são decorrentes da ação do próprio vírus no sistema nervoso.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estabelecer modelo *in vitro* de infecção por ZIKAV em células PC12-ADH e contribuir para o esclarecimento da infecção do ZIKAV em células do sistema nervoso.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Estabelecer cultura de células PC12-ADH e avaliar o processo de diferenciação celular induzido por NGF.
- 2) Estabelecer protocolo de infecção por Zika vírus em células PC12-ADH, diferenciadas e não diferenciadas.
- 3) Avaliar a infecção de células PC12-ADH.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes poli-D-lisina (PDL), dimetil sulfóxido (DMSO), penicilina, estreptomicina, soro fetal bovino (SFB), soro de cavalo (HS), tripsina e fator de crescimento do nervo (NGF) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O meio de cultura HAM F12 Nutrient Mixture foi adquirido da Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Os reagentes utilizados para a realização do Western blot foram a albumina sérica bovina (BSA) da empresa Biolabs (Beverly, MA, USA), solução de Bradford adquirida da empresa BioRad (Hercules, CA, USA), e o gel de poliacrilamida para a separação das proteínas e o kit de detecção de western blot (Solução Intensificadora de Luminol e solução peróxido) foram da GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Inglaterra). O anticorpo primário utilizado foi o Anti-Flavivirus E-glycoprotein (HF8-1/C1-6/E12), da Abcam, e o anticorpo secundário foi o Goat Anti-mouse IgG-HRP, da Santa Cruz Biotechnology. Como controle interno, foi utilizado Actin Antibody (I-19): sc-1616 e como correspondente o Donkey Anti-goat IgG-HRP

3.2 Cultura de células

A técnica de cultivo celular tem como finalidade estudar as células animais fora do organismo, sob controle regular, realizando conjunto de técnicas que permitam que as células se mantenham vivas e desenvolvam suas propriedades e comportamentos a serem estudados. Mesmo que a proliferação das células *in vitro* seja diferente da proliferação *in vivo*, existem algumas vantagens do cultivo celular como modelo experimental, por exemplo, a economia e o controle existente durante todo o processo de cultivo. Essas vantagens são evidentes quando se compara com o uso do próprio animal em experimentos, e com isso, sabe-se que o cultivo de células é o principal modelo para substituir os animais em experimentos (Guimarães *et al.*, 2010). Além disso, o uso de células corrobora a política internacional dos 3Rs em experimentação animal (*“replacement”, “reduction”, “refinement”*).

Para a realização do estudo foram utilizadas células PC12-ADH que foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Adriana Lofrano do Laboratório de Farmacologia Molecular adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em frascos de cultura celular (criotubos) com meio HAM F12, em freezer a -80°C . O meio de cultura foi suplementado com 1% de solução de penicilina e estreptomicina, 15% de soro de cavalo, 2,5% de soro fetal bovino e 0,12% de bicarbonato de sódio para a cultura.

Inicialmente, as células foram descongeladas, ressuspensas em 15 mL de meio F12 suplementado e plaqueadas de forma uniforme em placas de petri de 35 mm. As células então foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO_2 , e após atingirem no mínimo 80% confluência na placa, geralmente após 5 dias de cultivo, as mesmas foram utilizadas para os experimentos conforme descrito abaixo.

3.3 Diferenciação celular

Os ensaios de diferenciação celular foram realizados em placas com 6 poços, de $9,5\text{ cm}^2$. Após a confluência das células, as mesmas foram tripsinizadas (tripsina 0,5%), e plaqueadas com meio de diferenciação (MD) (meio F12, 1% de HS e 1% de solução de penicilina e estreptomicina) em diferentes concentrações para o estabelecimento do protocolo de diferenciação celular. As placas foram previamente tratadas com poli-D-lisina (PDL) para melhorar a adesão das células ao substrato.

O crescimento de neuritos nas células PC12-ADH é o que caracteriza sua diferenciação, desta forma, é necessário o acréscimo de fator de crescimento do nervo (NGF) ao meio de diferenciação (MD), utilizado na concentração de 100 ng/mL. Após a cultura de células atingir 80% de confluência, realizamos culturas com diferentes densidades celular, variando de 20.000 células/poço a 130.000 células/poço até ser estabelecida a densidade ideal para a visualização dos neuritos. O plaqueamento então é realizado no dia 0 e após 24h é iniciado o tratamento com o NGF, como ilustrado na **figura 4**. As culturas foram mantidas por

no máximo 8 dias já que após este período ocorre aglomeração e morte celular (Drubin et al. 1985).

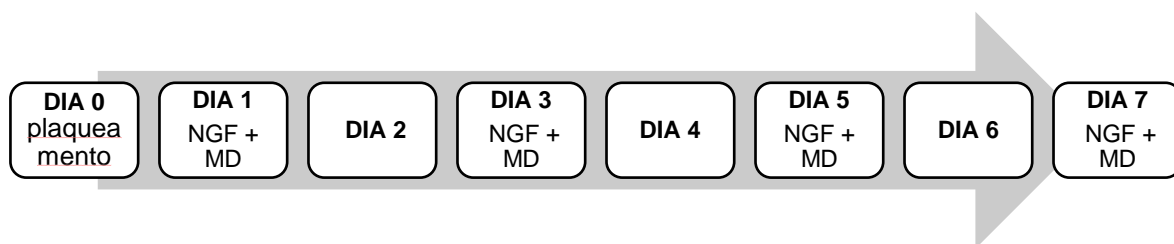


Figura 4: Esquema de cultura de células PC12-ADH em processo de diferenciação celular.

3.4 Infecção das células pelo ZIKAV

O protocolo seguido para a infecção das células PC12-ADH com o ZIKAV é o disponibilizado pela FIOCRUZ de titulação viral em células Vero, onde é disponibilizado o cálculo do título viral:

$$\text{Título} = P \times F \times 10x \text{ (PFU/mL)}$$

PFU – Plaque-forming unit (unidades formadoras de placa, ou seja, quantidade de vírus infectante).

P: média do número de placas obtido na diluição em que se contou as placas

F: fator de correção para expressar o título de PFU/mL (1000 µL/volume do inóculo).

10x: diluição em que as placas foram contadas.

O Zika vírus utilizado nos experimentos é proveniente de um paciente infectado em Pernambuco (*ZIKV/H, sapiens/Brazil/PE243/2015*). Esse vírus foi colhido e submetido a uma amplificação viral em células C6/36 em quatro placas de 75 cm². As células C6/36 são uma linhagem proveniente da larva do mosquito *Aedes albopictus*, muito utilizadas em replicação de *Flavivirus*. Os vírus foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Virologia Molecular da FS, em alíquotas recém-preparadas de 6x10⁵ PFU/mL. Com isso, utilizamos para a infecção uma quantidade de 80.000 células/poço, e assim o cálculo foi feito para MOI 1 e MOI 2

(*Multiplicity of Infection* – é a multiplicidade da infecção, ou seja, MOI 1 é 01 vírus para infectar 01 célula, MOI 2, são 02 vírus para infectar 01 célula).

As células foram tratadas conforme descrito no item 3.2 e 3.3, ou seja, foram infectadas células diferenciadas no quarto dia do protocolo de diferenciação, e células não diferenciadas após dois dias em cultura. No momento da infecção, o meio foi substituído pelo meio F12 sem adição de soro. Em seguida, as células foram inoculadas com o vírus MOI 1 e 2 por 2h, em agitação leve na incubadora com CO₂, a 37°C. Após esse período de incubação do vírus, retirou-se o meio contendo o vírus e cada poço foi lavado com PBS para retirada de qualquer resíduo viral. Em seguida, foi adicionado às células o meio de diferenciação (sem adição de NGF e com NGF na cultura das células diferenciadas). Após essas etapas, as células ficaram incubadas por mais 48h, e somente após esse período, iniciou-se os procedimentos para a detecção das proteínas virais.

3.5 Detecção de proteínas do ZIKAV em células PC12-ADH por meio da técnica de Western Blot

Para a avaliação da expressão proteica das amostras de células PC12-ADH, foi utilizada a técnica de Western Blot. Tanto as células não diferenciadas como as diferenciadas foram infectadas com o vírus da ZIKA. Após 48h da infecção, as células foram lavadas com PBS e removidas da placa. Realizou-se a extração das proteínas com o tampão de lise *Radioimmunoprecipitation buffer* RIPA (150 mM de Cloreto de sódio, 1% NP-40, 0,5% de Deoxicolato de sódio, 0,1% de SDS - sodium duodecyl sulfate, 50 mM de Trizma base) contendo coquetel inibidor de protease (1:200) e inibidores de fosfatase (1mM de Pirofosfato de sódio e 1mM de Ortovanadato de sódio).

O total de proteínas em cada amostra foi determinado pelo método de Bradford, com a utilização de Albumina Sérica Bovina (BSA 1mg/mL) como curva padrão. As amostras foram processadas com o auxílio do aparelho sonicador (Sonics Vibra-Cell) e centrifugadas à 12000 rpm, 4°C, por 5 minutos. O equipamento utilizado para realizar a leitura das amostras foi o espectrofotômetro modelo DXT 800 Multimode Detector (Beckman Coulter) do Laboratório de

Farmacologia Molecular da UnB (FarMol). As análises foram feitas em comprimento de onda 595 nm, em placa de 96 poços.

Após a quantificação proteica das amostras, 12,5 µg de proteína, foram adicionadas ao tampão de amostra Laemmli (6X) recém-preparado com 5% de 2-mercaptoetanol. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel gradiente (4 – 12%) de poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas foram então separadas por eletroforese (Amersham ECL Gel Box, GE Helthcare) a 100 volts por 2 horas. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) a 24 volts durante 1 hora e 30 minutos.

Em seguida, as membranas foram bloqueadas em solução salina tamponada com Tris (20 mM de Tris, 500 mM de NaCl, pH 7,5) contendo 0,1% de Tween 20 (TBST) e 5% de leite em pó desnatado, durante 1 hora à temperatura ambiente, e depois incubadas com anticorpo primário Anti-Flavivirus E-glycoprotein (HF8-1/C1-6/E12) 1:500 em TBST com 5% de leite em pó desnatado, com exposição *overnight* à 4°C.

No dia seguinte, a membrana foi lavada com TBST, 3 vezes com intervalos de 10 minutos, e posteriormente incubada com o anticorpo secundário correspondente, Goat Anti-mouse IgG-HRP, 1:5000, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após outras lavagens, a membrana foi exposta ao reagente de detecção ECL-Prime (Amersham, GE Healthcare) por 5 min, e em seguida a revelação foi realizada por quimioluminescência, pelo equipamento Amersham Imager 600.

Como controle interno do experimento, optamos por avaliar a expressão da proteína actina e utilizamos anticorpo Goat Anti-actina, na concentração de 1:1.000. Como anticorpo secundário correspondente foi utilizado Donkey Anti-goat IgG-HRP, 1:10.000. Foram realizados dois experimentos de Western blot para apresentação dos resultados.

4.0 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento da densidade ideal de células para o ensaio de diferenciação celular

Para estabelecer a densidade adequada de células que seria utilizada durante o desenvolvimento deste projeto, foram realizadas culturas com diferentes números de células por poço. A diferenciação das células PC12-ADH em neurônios é avaliada através do crescimento de neuritos. Os ensaios foram realizados em placas de 6 poços, tratadas com PDL, para facilitar a adesão das células.

Não há definição na literatura sobre qual é a densidade de células ideal para a diferenciação de PC12-ADH em neurônios. Assim, observamos que diferentes autores utilizavam densidade que variava de 7.600 células por poço (Das, Freudenrich e Mundy, 2004), 67.000 células por poço (Klein, Brown e Turnley, 2007), 90.000 células por poço (Drubin et al., 1985), 200.000 células por poço (Ferreira et al., 2016), entre outros. Desta forma, iniciamos os experimentos com densidade de 20.000, 30.000 e 50.000 células/poço. Nos dias 1, 3 e 5 as células foram tratadas com NGF (100 ng/mL), de acordo com Radio et al (2008), para induzir diferenciação. No entanto, apesar de observarmos o crescimento de neuritos em algumas células, havia pouca confluência (**figuras 5 e 6**), muitas células não estavam aderidas e ao sétimo dia, morreram.



Figura 5: Neuritogênese de células tratadas com NGF (100 ng/mL). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 20.000 células/poço no dia 5 da diferenciação.

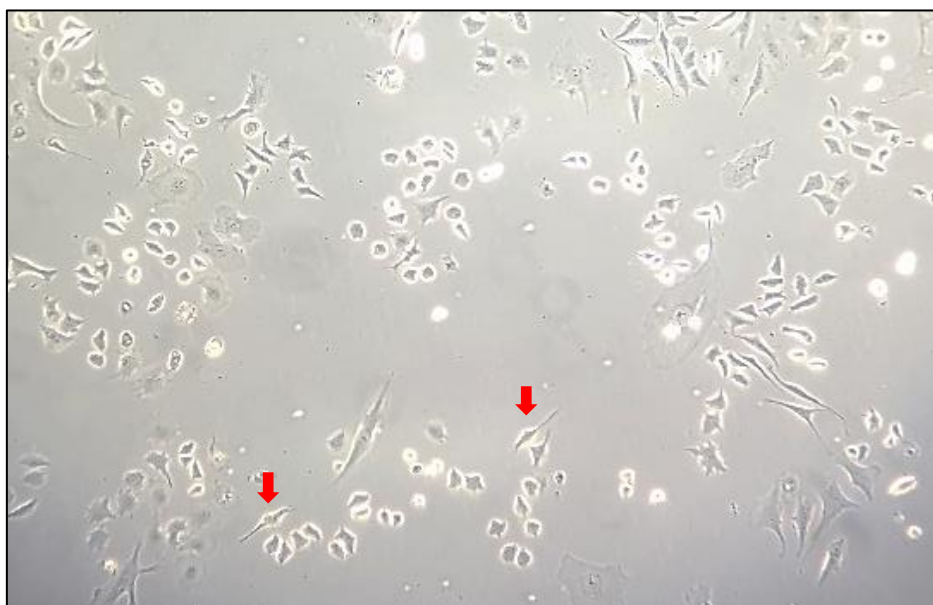


Figura 6: Visão geral das células com 50.000 células/poço, com poucos neuritos. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 50.000 células/poço no dia 5 da diferenciação.

A partir destes resultados, foram avaliadas as densidades de 100.000 e 130.000 células/poço. Assim no segundo dia o meio de cultura foi substituído pelo meio de diferenciação com a adição de NGF na concentração de 100ng/mL, assim como no quarto dia. Entretanto, não houve continuidade nos experimentos, pois as células apresentaram contaminação com fungos, como mostrado na **figura 7**.

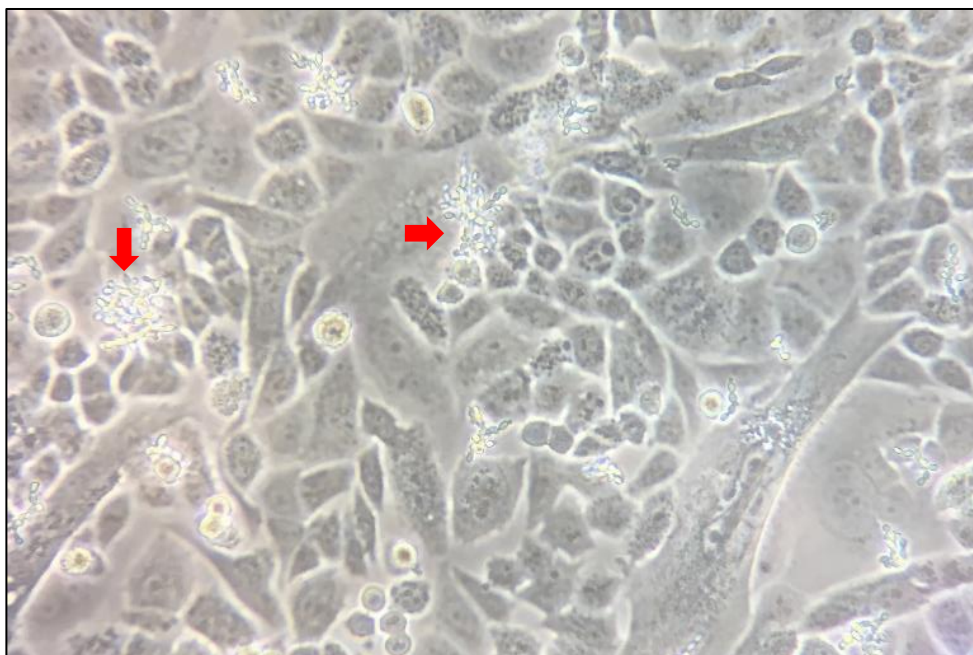


Figura 7: Células contaminadas com fungos. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 200x), com 130.000 células/poço.

Para verificar se havia contaminação no meio de cultura utilizado, todos os reagentes foram testados em meio Luria-Bertani (LB), mas nenhuma alteração (crescimento de microorganismos) foi observada após uma semana. Consideramos que a contaminação foi um evento pontual e uma nova alíquota de células foi descongelada para dar seguimento aos experimentos.

Utilizando a densidade de 130.000 células/poço (**figura 8**), o NGF foi adicionado de acordo com o protocolo citado anteriormente. No dia 5 da diferenciação, as células apresentaram uma morfologia diferenciada (presença de grânulos), mas não apresentaram crescimento de neuritos (**figura 9**).

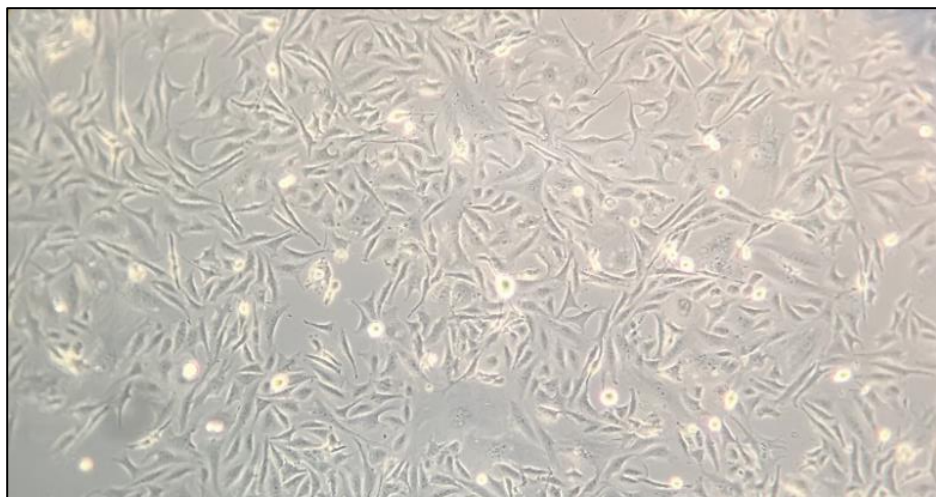


Figura 8: Visão geral da densidade de 130.000 células/poço. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x) no dia 1 da diferenciação.



Figura 9: Visualização de grânulos nas células. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 130.000 células/poço no dia 5 da diferenciação.

Nos experimentos que utilizamos a densidade de 100.000 células/poço, percebemos que esta seria mais adequada para a visualização dos neuritos, uma vez que era possível observar espaços entre as células. Surpreendentemente, nos experimentos seguintes, mesmo com a adição de NGF (100 ng/mL) as células continuaram a sofrer mitose. Essa observação ficou bem clara no último dia de cultura, quando comparado ao primeiro dia, como mostram as **figuras 10, 11 e 12**.

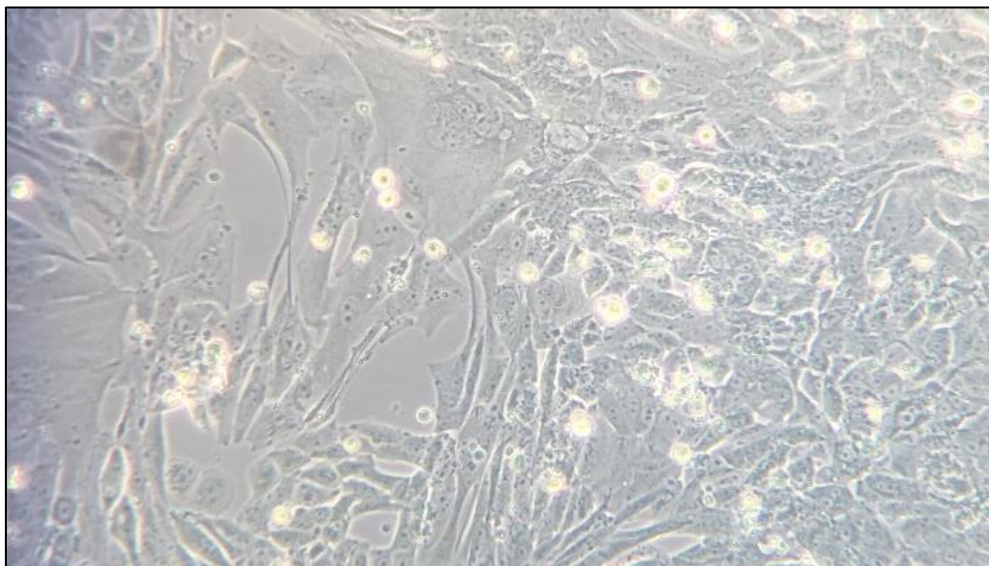


Figura 10: Células PC12-ADH no primeiro dia com NGF (100ng/mL). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 100.000 células/poço no dia 1 da diferenciação.

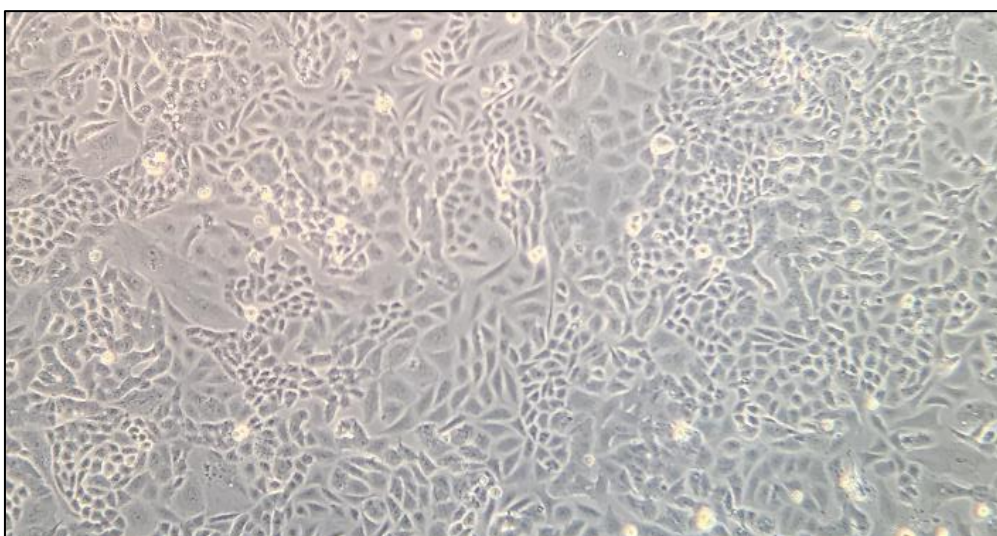


Figura 11: Células PC12-ADH no quarto dia com NGF (100ng/mL). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 100.000 células/poço no dia 4 da diferenciação.

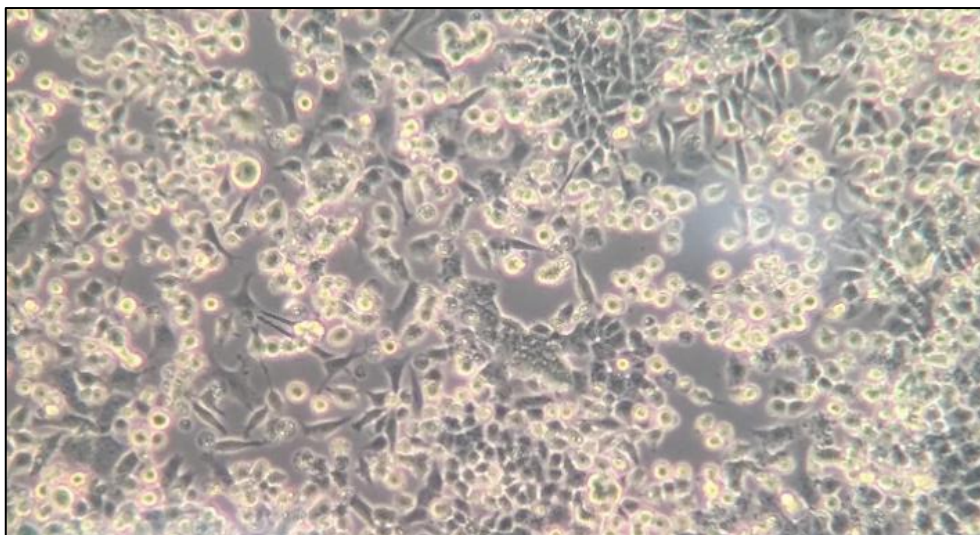


Figura 12: Células PC12-ADH no último dia da cultura celular. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x), com 100.000 células/poço no dia 7 da diferenciação.

Mediante esses resultados, duas novas variáveis foram testadas. Primeiro investigamos se o PDL poderia ser o responsável pela aglomeração das células nos poços. Além disso, também avaliamos se a densidade de 80.000 células por poço seria a densidade ideal para a visualização da neuritogênese. Desta forma, os experimentos foram realizados em placas sem pré-tratamento com PDL. Seguindo o protocolo estabelecido, as células passaram pelo processo de diferenciação até o sétimo dia em cultura. Após sete dias em meio de diferenciação, ou seja, no último dia da cultura, observamos que as células desenvolveram vários neuritos, conforme demonstrado nas figuras seguintes.



Figura 13: Visualização do crescimento de neuritos em placas com 80.000 células por poço, sem tratamento com PDL. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x) no dia 7 da diferenciação.

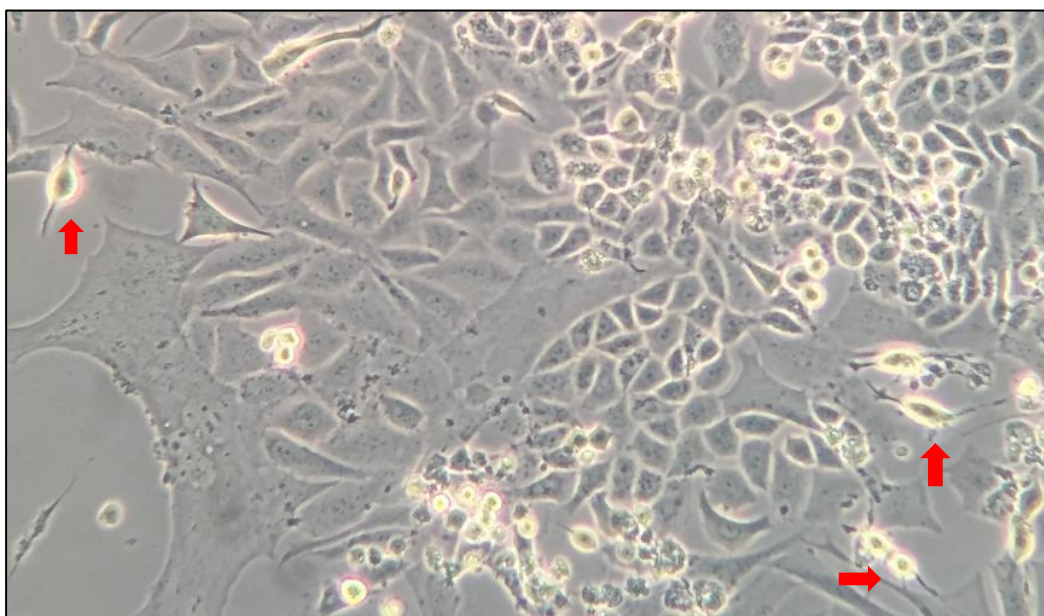


Figura 14: Visualização do crescimento de neuritos em placas com 80.000 células por poço, sem tratamento com PDL. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x) no dia 7 da diferenciação.

Uma vez que as células apresentaram neuritogênese, e diferentes autores relatam a importância do uso do PDL (Fuji et al, 1982 Fujita, Lazarovici e Guroff, 1989; Jesky & Chen, 2016), avaliamos a cultura de células na densidade de 80.000 células por poço em placas previamente tratadas com PDL. Como demonstrado nas **figuras 16 e 17**, as células apresentaram diferenciação já no quinto dia de cultura, e também não apresentaram formação de aglomerados.

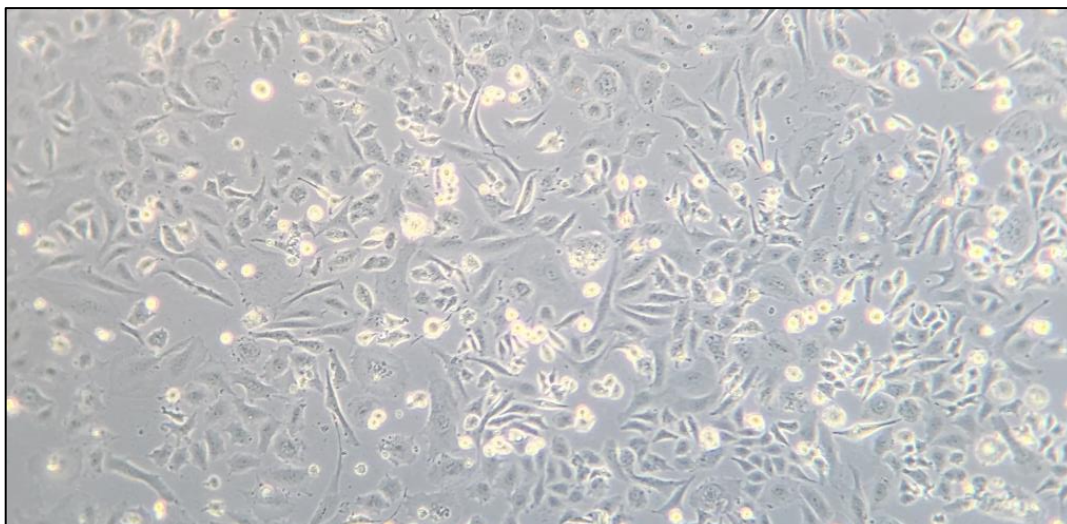


Figura 15: Visão geral das PC12-ADH com a densidade ideal estabelecida, de 80.000 células/poço, com pré-tratamento da placa. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x) no dia 1 da diferenciação.

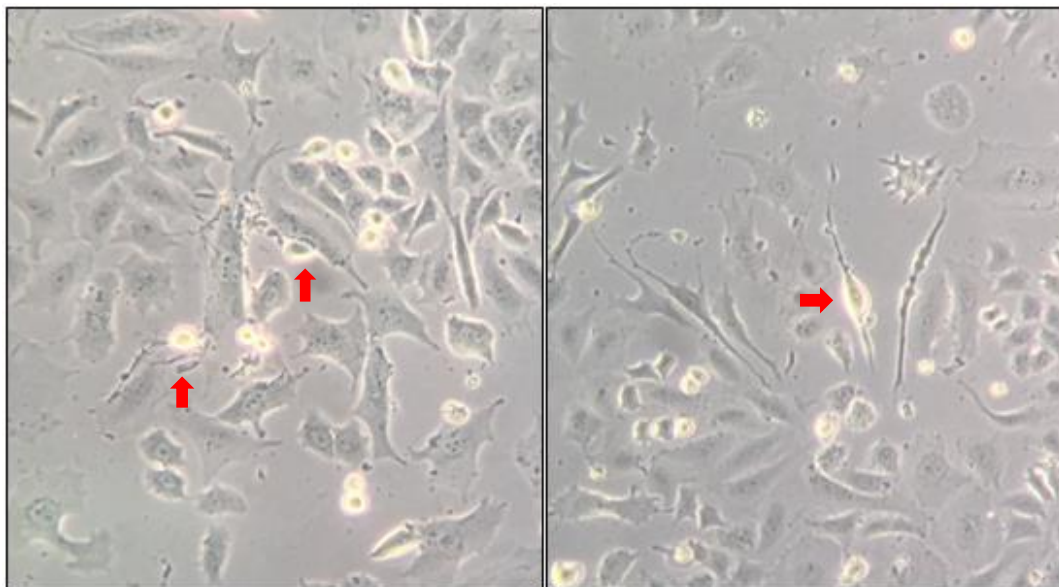


Figura 16: Neuritogênese observada após 5 dias com NGF (100 ng/mL). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 200x) no dia 5 da diferenciação.

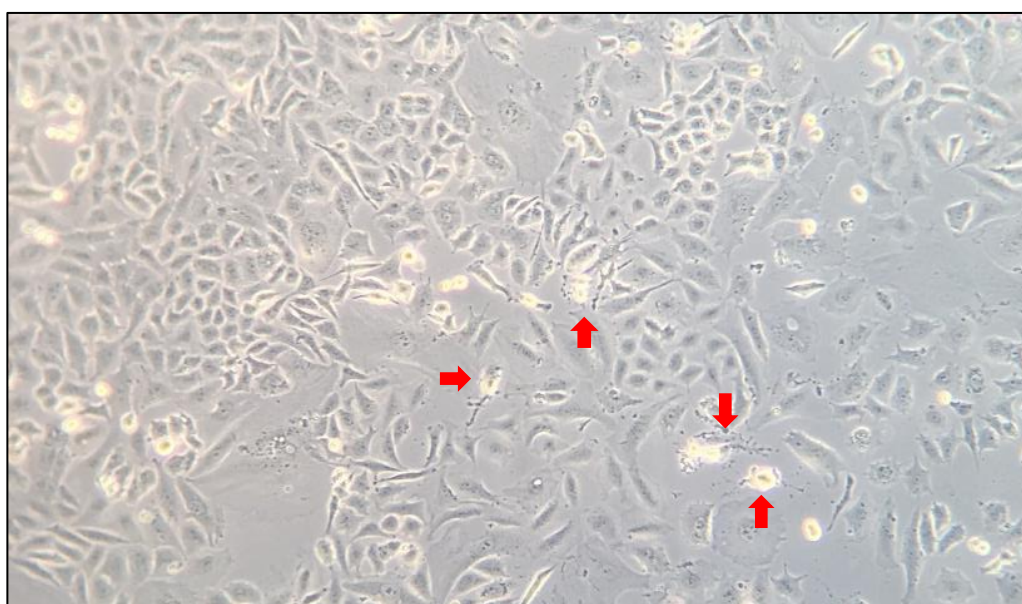


Figura 17: Neuritogênese observada após 5 dias com NGF (100 ng/mL). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x) no dia 5 da diferenciação.

4.2 Diferenciação de células PC12-ADH sem adição de NGF.

De acordo com Teng et al. (2006), as células PC12-ADH podem possuir grau elevado de diferenciação antes ou depois da adição de NGF ao meio de cultura, ou seja, as células que não estão no meio de diferenciação suplementado com NGF também podem apresentar crescimento de neuritos. Foi possível visualizar essa situação em 2 culturas diferentes, onde as células ainda estavam no período confluência, ou seja, não foi realizado cálculo da densidade celular e as placas não foram pré-tratadas com PDL.

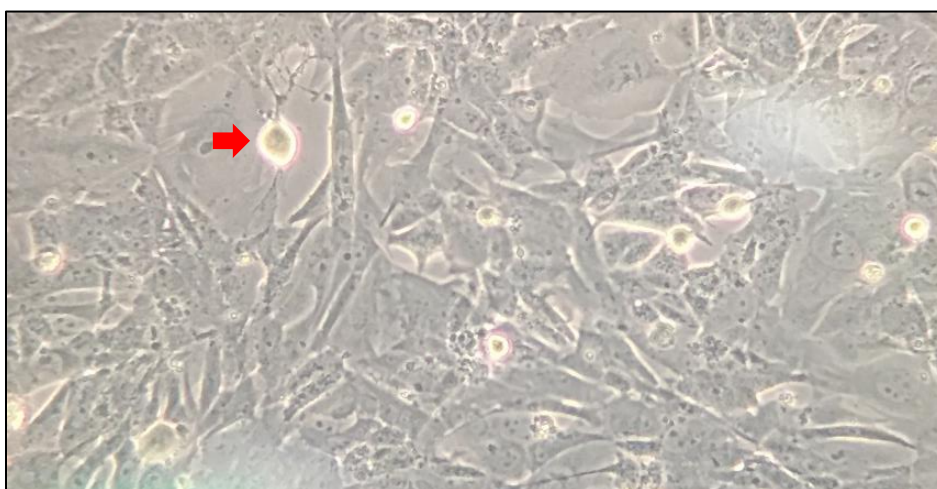


Figura 18: Crescimento de neuritos observado em cultura sem suplementação com NGF. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100x).



Figura 19: Crescimento de neuritos observado em cultura sem suplementação com NGF. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 200x).

4.3 Avaliação da infecção do ZIKAV nas células PC12-ADH

Para investigar se as células PC12-ADH eram suscetíveis a infecção, utilizou-se a multiplicidade de infecção (MOI) de 1 e de 2 em culturas não diferenciadas com densidade de 80.000 células/poço. A quantidade de vírus calculada foi de 390 μ L, de acordo com os cálculos apresentados no protocolo da FIOCRUZ. Com isso, para se obter MOI de 1, foi preparada uma solução com 390 μ L do vírus e 390 μ L do meio de cultura sem suplementação, e assim 260 μ L foi adicionado em cada poço. Após 2h de adsorção, o meio contendo o vírus foi retirado e substituído pelo meio F12, e após 48h, as células foram coletadas para a confirmação da infecção através da análise da expressão da glicoproteína E (HF8-1/C1-6/E12).

Além disso, também avaliamos a susceptibilidade à infecção viral das células PC12-ADH diferenciadas para comparar o tropismo do vírus, ou seja, comparar a propensão que o ZIKAV pode ter em infectar células neurônio *like*. As células também foram expostas ao vírus (MOI de 1 e MOI de 2) no dia 4 do protocolo de diferenciação, seguindo assim os mesmos procedimentos citados anteriormente.

Com isso, para realizar a técnica do Western blot utilizamos 12,5 µg de proteína. Como podemos observar na figura abaixo, não há expressão da glicoproteína-E na faixa de 50 kDa. Assim podemos concluir que não houve infecção das células PC12-ADH pelo ZIKAV. Os quatro primeiros poços são referentes às células não diferenciadas, e os três últimos referentes às células diferenciadas. O poço 1 é referente às células PC12-ADH, e os poços 2 e 5 são referentes ao controle da infecção, ou seja, são as células que passaram pelo mesmo procedimento da infecção, mas sem adição do vírus no meio de cultura.

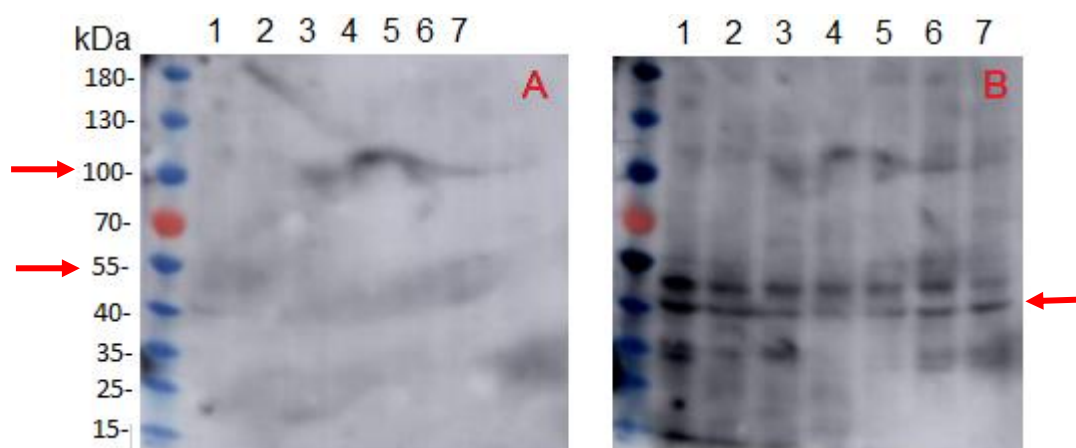


Figura 20: A) Representação do Western blot com o Anti-Flavivirus. B) Representação do Western blot com Actina. 1) Células PC12-ADH; 2) Controle (células não infectadas); 3) MOI 1; 4) MOI 2; 5) Controle (células não infectadas, diferenciadas); 6) MOI 1 em células diferenciadas; 7) MOI 2 em células diferenciadas.

5.0 Discussão

A infecção pelo ZIKAV após o surto ocorrido no Brasil foi reconhecida como um problema na saúde pública pela OMS em 2016. As consequências ligadas a infecção neonatal são principalmente a microcefalia e anomalias oculares, e em adultos, destacam-se a meningoencefalite e a síndrome de Guillain-Barre (SGB). No SNC o ZIKAV atravessa a barreira placentária e infecta as células progenitoras neurais (CPN) e as células retinais neurais (Li et al., 2016).

Periféricamente, a infecção pelo ZIKAV também pode gerar paralisia aguda flácida em adultos, um sintoma proveniente da SGB, que é uma apresentação de fraqueza frequente durante horas ou dias. Sabe-se que nas regiões endêmicas, houve um aumento de 20 a 40 vezes das taxas de paralisia aguda flácida, mas ainda são necessários estudos aprofundados que comprovem que essa paralisia aguda flácida é induzida por ZIKAV (Cao-Lormeau et al., 2017). A síndrome de Guillain-Barre é um caso de neuropatia periférica de origem auto-imune, desencadeado após a infecção, produzindo paralisia, dor e fraqueza. São sintomas temporários, mas possui riscos de que ocorra paralisia respiratória (Lazear et al., 2016).

Um dos estudos que apresenta casos de associação da SGB com o ZIKAV é Dos Santos *et al.* (2016). Os autores mostraram que nos países República Dominicana, Colômbia, Brasil, Venezuela, Honduras, El Salvador e Suriname houve registro de 164.237 casos de infecção por ZIKAV e de 1.474 casos de SGB, de abril de 2015 até março de 2016. Além disso, Cao-Lormeau et al. (2017) apresentaram casos de pessoas com Guillain-Barré e que estavam recentemente infectadas com o vírus da Zika. Sabe-se que a fraqueza relacionada à síndrome se desenvolve cerca de 6 a 10 dias após os sintomas iniciais da Zika. Com isso, considera-se que essa manifestação apareça de forma muito rápida, pois é o primeiro contato da pessoa com o vírus e é uma síndrome de origem autoimune. Finalmente, Lucchese & Kanduc (2016) demonstraram que existe uma sequência de peptídeos da poliproteína do ZIKAV que sobrepõe, ou seja, são idênticas, à algumas proteínas humanas que são ligadas à mielina, desmielinização e neuropatia axonal. Existe então, uma necessidade de estudos mais aprofundados que expliquem essa relação de causa e efeito.

Atualmente, um dos maiores questionamentos existentes é com relação às razões pelas quais o vírus da Zika começou a emergir como um neuropatógeno somente a pouco tempo, sendo que ele já é reconhecido a mais de 50 anos. Existem algumas hipóteses que podem explicar, como por exemplo a evolução das estirpes virais. Mas existem evidências de que nas cepas mais antigas comparadas com as mais recentes, a mudança no RNA viral é menor do que 1% e não existem diferenças entre as cepas existentes do ZIKAV, tanto com relação ao tropismo neural como à morte celular (Lazear et al., 2016). Outra possibilidade que pode existir é com relação ao vetor ou via de transmissão, mas existem hipóteses de que a mesma cepa do mosquito é a responsável pelas transmissões nesses anos todos, e os relatos de casos de outras formas de transmissão, além do mosquito, são mínimas quando comparadas ao *Aedes Aegypti* (Li et al., 2016).

Assim, com o intuito de estudar essa relação do ZIKAV e o sistema nervoso periférico, bem como estabelecer ferramentas para investigar esta interação, nós utilizamos o modelo de células PC12-ADH. As células PC12-ADH são consideradas análogas das células precursoras do sistema nervoso periférico (neurônios simpáticos) após a diferenciação induzida pelo NGF, na medida em que sintetizam neurotransmissores. Na ausência de NGF, as células PC12-ADH não são eletricamente excitáveis devido à baixa densidade de canais de sódio presentes, embora seja encontrado um número suficiente de canais potássio dependentes de voltagem. Após o tratamento com NGF, há um aumento gradual de 10 a 20 vezes na densidade dos canais de sódio, e as células adquirem excitabilidade neuronal.

Desta forma, para estabelecer o protocolo para infecção com ZIKAV, primeiro implementamos o ensaio de diferenciação das células PC12-ADH. Existem diversos protocolos já estabelecidos para diferenciar estas células, como Jesky & Chen (2016), onde as células permanecem na presença de NGF por 7 dias, em placas com PDL e troca-se metade do meio a cada 3/4 dias. Fujii et al. (1982) estabelece uma troca de metade do volume do meio todos os dias da cultura, por 7 dias; em Drubin et al. (1985) a diferenciação ocorre de 5 a 7 dias e de acordo com Radio et al. (2008), o NGF deve ser adicionado nos dias 2, 4, 6 e 8, junto com o meio de diferenciação (MD), sendo este o protocolo utilizado nos nossos experimentos. Em todos esses, a concentração de NGF é de 100 ng/mL.

Posteriormente, avaliamos diferentes densidades de células PC12-ADH em culturas com e sem diferenciação. Nos experimentos que utilizamos baixa densidade de células (20.000 a 50.000 células/poço), observamos morte celular antes da finalização do protocolo de diferenciação. Porém, Das et al (2004) utilizando 2.000 células/cm² demonstraram crescimento de neuritos nestas condições experimentais. Uma das hipóteses para explicar estes resultados poderia ser a quantidade de passagens que as células foram submetidas. Estes autores utilizaram células na décima passagem, enquanto que as células utilizadas no nosso estudo foram doadas e não havia descrição do número de passagens. Outros autores já relataram que as células PC12-ADH podem sofrer alterações fenotípicas somente pela quantidade de vezes em que foram subcultivadas, como Teng et al. (2006), o que poderia influenciar na resposta dessas células ao NGF.

A densidade de células necessária para o revestimento dos poços é uma fonte de variabilidade entre os experimentos. Isto ficou evidente quando aumentamos a densidade das células para mais de 100.000 células/poço e não foi possível avaliar o crescimento de neuritos. Assim, ficou estabelecido a densidade de 80.000 células/poço, uma vez que observamos neuritogênese mais pronunciada. Corroborando os nossos dados, Drubin et al. (1985) afirmam que a densidade ideal de células para a diferenciação é de 10.000 a 20.000 células/cm², pois uma alta densidade celular pode impedir o crescimento dos neuritos.

Um dos objetivos do nosso trabalho foi o de avaliar o processo de diferenciação celular induzido por NGF. A diferenciação de células PC12-ADH pode ser investigada por métodos morfológicos que incluem: avaliação do tamanho do corpo celular, avaliação da porcentagem de células que desenvolvem neuritos, medida do comprimento dos neuritos ou ainda o crescimento de neuritos nas células. Neste trabalho foi estabelecido como critério para a diferenciação celular o crescimento de neuritos nas células. Assim, culturas que apresentavam células com presença de neuritos foram consideradas diferenciadas, por meio de análise visual. Não foi objeto de estudo quantificar a porcentagem de células diferenciadas, mas alguns estudos, como Ferreira et al., (2016), demonstram que após 72h de exposição ao NGF, aproximadamente 6% das células se diferenciam em neurônios, utilizando também o critério de crescimento de neuritos. Já Klein; Brown e Turnley,

(2007) relataram que também após 72h de exposição ao NGF, 30% das células apresentaram diferenciação. Sabe-se que a resposta ao NGF pode ser baixa mesmo quando as células são tratadas por longos períodos, podendo ser devido à alta densidade celular, ou até mesmo a inativação do NGF, e também por existir variantes de células PC12-ADH que não são responsáveis ao NGF. Percebemos também, como demonstrado nos resultados, que as células sem suplementação com NGF igualmente são capazes de desenvolver neuritos, conforme já mencionado por Teng et al (2006).

Uma vez estabelecido o protocolo de diferenciação celular, as células foram expostas ao ZIKAV. Nossos resultados não mostraram que as células PC12-ADH, diferenciadas ou não, foram infectadas com o vírus. Para avaliar a possível infecção com o ZIKAV optamos por investigar se após a exposição das culturas ao vírus as células expressavam proteína viral específica, a glicoproteína do envelope viral, também chamada de glicoproteína E.

É possível utilizar três principais abordagens diferentes para verificar a infecção em nosso modelo de cultura de células PC12-ADH. O primeiro seria avaliar a expressão gênica através da técnica de PCR, o segundo a expressão proteica pela técnica do Western blot e o terceiro avaliar a formação de partículas de vírions liberadas no meio de cultura por meio da quantificação de vírus por contagem de unidades formadoras de placa (PFU). A opção pela técnica de Western Blot foi baseada na experiência prévia do laboratório, bem como na disponibilidade do anticorpo anti-glicoproteína E de Flavivirus.

Muito embora o resultado tenha sido negativo, ao avaliarmos as imagens imunorreativas é possível verificar a formação de bandas na altura de 100 kDa, enquanto as mesmas deveriam estar presentes em torno de 55 kDa, pois o peso molecular estimado é de 53,81 kDa. Assim, não é possível determinar se estas são bandas inespecíficas, ou se em células PC12-ADH a expressão de glicoproteína E é diferente do esperado, em função de modificações pós-traducionais, tais como glicosilação, fosforilação e ubiquitinação.

Não existe ainda na literatura estudos relacionando o Zika vírus com as células PC12-ADH. Todavia, Li et al. (2017) demonstraram que o vírus da encefalite

japonesa (JEV), que é da mesma família do ZIKAV, é capaz de infectar células PC12-ADH e que a diferenciação induzida com exposição ao NGF por 5 dias aumenta a expressão da proteína NS3, uma proteína não estrutural do JEV. Baseado neste estudo, acreditamos que é possível infectar células PC12-ADH com o ZIKAV e que será necessário aprimorar o protocolo de expressão proteica, ou ainda avaliar a infecção pela técnica de PCR. Uma das limitações do nosso estudo é a não utilização de um controle positivo nos experimentos de expressão proteica. Como este anticorpo ainda não havia sido testado em amostras provenientes de outros tecidos e o nosso laboratório foi o primeiro a utilizá-lo não foi possível a utilização de alguma amostra positiva para o ZIKAV. Outros fatores que devem ser levados em consideração são a quantidade de vírus (MOI) que foi utilizada, assim como a quantidade de proteínas nos experimentos de Western blot.

Em suma, a implementação do modelo de cultura de células PC12-ADH diferenciadas no Laboratório de Farmacologia Molecular pode contribuir para investigar diferentes aspectos da função neuronal. Com relação à infecção pelo ZIKAV, ainda são necessários mais estudos para verificar susceptibilidade das células PC12-ADH ao Zika, uma vez que esses resultados vão subsidiar estudos mais complexos da neuropatogênese do ZIKAV.

6.0 Conclusões

Foi estabelecido protocolo para diferenciação celular de PC12-ADH em neurônios, uma vez que células tratadas com NGF exibem crescimento de neuritos. A utilização dessas células é uma opção viável para estudar o desenvolvimento e função neural. No entanto, para ser estabelecida uma real correlação com o sistema nervoso periférico, mais estudos se fazem necessários, como, por exemplo, com a utilização de culturas primárias de neurônios de gânglio da raiz dorsal.

Apesar do resultado final obtido ser negativo com relação à infecção pelo ZIKAV, o estabelecimento do protocolo de diferenciação pode contribuir para futuros experimentos tanto com adsorção viral, como estudos de funções neurológicas, buscando compreender como este vírus produz alterações neurológicas periféricamente.

7.0 Referências Bibliográficas

BENETI, G. M. e SILVA, D. L. D.; Síndrome de Guillain-Barré. *Semina: Ciências Biológicas e Saúde*. Londrina, v. 27, n. 1, p. 57-69, jan./jun. 2006.

BRASIL et al. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. **Lancet**, Case Report, v. 387, 2016.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia Europe PMC Funders Group. v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2017.

CHAVALI, P. L. et al. Neurodevelopmental protein Musashi 1 interacts with the Zika genome and promotes viral replication. **Science**, v. 9243, n. June, 2017.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016.

DAS, K. P.; FREUDENRICH, T. M.; MUNDY, W. R. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: A comparison of morphological and neurochemical measures. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, n. 3, p. 397–406, 2004.

DOS SANTOS, T. et al. Zika Virus and the Guillain-Barre Syndrome - Case Series from Seven Countries. **N Engl J Med**, v. 375, n. 16, p. 1598–1601, 2016.

DRUBIN, D. G. et al. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubulo assembly-promoting factors. **J. Cell Biol.**, v. 1985, n. 15, p. 1799–1807, 1985.

FERREIRA, R. S. et al. Non-cytotoxic Concentration of Cisplatin Decreases Neuroplasticity-Related Proteins and Neurite Outgrowth Without Affecting the Expression of NGF in PC12 Cells. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 11, p. 2993–3003, 2016.

FUJII, D. K. et al. Neurite outgrowth and protein synthesis by PC12 cells as a function of substratum and nerve growth factor. **The Journal of Neuroscience**, v. 2, n. 8, p. 1157–75, 1982.

FUJITA, K.; LAZAROVICI, P.; GUROFF, G. Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. **Environmental Health Perspectives**, v. 80, p. 127–142, 1989.

FUNES, J. A. A.; MONTERO, V. A. M.; CARRANZA, E. M. Síndrome de Guillain-Barré: Etiologia y Patogénesis. **Revista de Investigación Clínica**, México, v.54, n.4, p.357-363, 2002. Disponível em:http://scielo-mx.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003483762002000400011&lng=es&nrm=isso

GUIMARÃES A. C. R. et al., Conceitos e Métodos para elaboração de profissionais em laboratórios de saúde.Vol. 2. Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

GULLAND, A. Zika virus is a global public health emergency. *BMJ* 2016;352:i657, **WHO**, 2016.

GREENE, L. A. Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. **Journal of Cell Biology**, v. 78, n. 3, p. 747–755, 1978.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 7, p. 2424–2428, 1976.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

HUANG, Y-J., S. et al. Flavivirus-Mosquito Interactions. **Viruses**, v. 6, p. 4703-4730, 2014.

JESKY, R.; CHEN, H. The neuritogenic and neuroprotective potential of senegenin against A β -induced neurotoxicity in PC 12 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 26, 2015.

KLEIN, R.; BROWN, D.; TURNLEY, A. M. Phenoxodiol protects against Cisplatin induced neurite toxicity in a PC-12 cell model. **BMC neuroscience**, v. 8, p. 61, 2007.

LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe*, v. 19, p. 720–730, 2016.

LI, H. et al. The Neurobiology of Zika Virus. **Neuron**, v. 92, n. 5, p. 949–958, 2016.

LI, J. R. et al. Susceptibility of naïve and differentiated PC12 cells to Japanese encephalitis virus infection. **IUBMB Life**, v. 69, n. 2, p. 79–87, 2017.

LUCCHESI, G.; KANDUC, D. Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barré syndrome, and beyond. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 8, p. 801–808, 2016.

MARTELLI, C. M. T. Microcephaly in Infants, Pernambuco State, Brazil, 2015. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 1090–1093, 2016.

MNISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 32, 2016. Boletim Epidemiológico. Portal da Saúde, v. 47, n. 33, 2016.

MNISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. Secretaria de Atenção em Saúde, Diretrizes de Estimulação Precoce, Crianças de zero a 3 anos com Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor Decorrente de Microcefalia. Plano Nacional de Enfrentamento à Microcefalia, 2016.

MORRIS, G. et al. Zika Virus as an Emerging Neuropathogen: Mechanisms of Neurovirulence and Neuro-Immune Interactions. **Molecular Neurobiology**, 2017.

NIKOLAY, A. et al. Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. **Vaccine**, 2017.

NUNES, M. L. et al. Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 92, n. 3, p. 230–240, 2016.

OLAGNIER, D. et al. Mechanisms of Zika Virus Infection and Neuropathogenesis. **DNA and Cell Biology**, v. 35, n. 8, p. 367-372, 2016.

RADIO, N. M. et al. Assessment of Chemical Effects on Neurite Outgrowth in PC12 cells Using High Content Screening. **Toxicological Sciences**, v. 105, n. 1, p. 106–118, 2008.

SBARDELLA, E., Routine genetic screening with a multi-gene panel in patients with pheochromocytomas. **Endocrine**, DOI 10.1007/s12020-017-1310-9, 2017.

TAVARES, A. C.; ALVES, C. B. L.; SILVA, M. A.; LIMA, M. B. C.; ALVARENGA, R. P. Síndrome de Guillain-Barré: Revisão de Literatura. Cadernos Brasileiros de Medicina, v.13, n.1, 2, 3 e 4, 2000. Disponível em: <<http://www.unirio.br/ccbs/revista/caderno%20brasileiro?sindguil.htm>

TENG K. K.; ANGELASTRO J. M.; CUNNINGHAM M. E.; GREENE L. A. Cultured PC12 cells: A model for neuronal function, differentiation, and survival. In Cell Biology, Four-Volume Set. Vol. 1. **Elsevier Inc.** 2006. p. 171-176. Available from, DOI: 10.1016/B978-012164730-8/50022-8

TIWARI, S. K. et al. Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 4, p. e24, 2017.

TSUNODA, I. et al. Neuropathogenesis of Zika Virus Infection : Potential Roles of Antibody-Mediated Pathology. *Acta Med Kinki Univ*, v. 41, p. 37–52, 2016.

UNSICKER, K. et al. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 7, p. 3498–3502, 1978.

ZANLUCA, C.; DOS SANTOS, C. N. D. Zika virus - an overview. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 295–301, 2016.

ZHANG, Q. et al. The prescriptions from Shenghui soup enhanced neurite growth and GAP-43 expression level in PC12 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 369, 2016.

